



# Lições para a Biologia da Conservação no Cerrado a partir dos Padrões de Diversidade Genética Populacional do Anfíbio *Physalaemus cuvieri*

Cristiane Gomes Barreto <sup>1</sup>

Vívian da Silva Braz <sup>2</sup>

Frederico Gustavo Rodrigues França <sup>3</sup>

## RESUMO

A fragmentação de habitats naturais tem aumentado intensamente nas últimas décadas. Neste trabalho, populações isoladas de *Physalaemus cuvieri* foram estudadas quanto à sua estrutura genética a partir de marcadores moleculares. Parte das amostras são de populações isoladas naturalmente por floresta tropical há cerca de seis mil anos atrás e outra parte proveniente de fragmentos isolados por uma matriz antrópica, formada há cerca de 40 anos. As populações dos fragmentos antigos e dos recentes não diferiram significativamente com relação às distâncias genéticas e aos componentes intra ou interpopulacional da diversidade genética. As distâncias genéticas são compatíveis com as distâncias espaciais. Entretanto, existe uma subestruturação pouco extensiva entre as populações e, nos fragmentos isolados há mais tempo, a diversidade genética diminui com a área do fragmento. É possível concluir que as pequenas populações de *Physalaemus cuvieri* podem ter a sua estrutura genética afetada pela fragmentação num espaço de tempo de poucas décadas.

**Palavras-Chave:** Estrutura Genética; Fragmentação de Habitats; *Physalaemus cuvieri*; RAPD; Populações Isoladas.

<sup>1</sup> Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade de Brasília. [crisgbarreto@gmail.com](mailto:crisgbarreto@gmail.com)

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente, Centro Universitário de Anápolis/ UniEVANGÉLICA. [vsbraz@gmail.com](mailto:vsbraz@gmail.com)

<sup>3</sup> Centro de Ciências Aplicadas e Educação, Departamento de Engenharia e Meio Ambiente, Universidade Federal da Paraíba. [fredericogrf@gmail.com](mailto:fredericogrf@gmail.com)

A ocupação de áreas naturais para o desenvolvimento urbano e agrícola tem aumentado continuamente em quase todo o mundo. Ao passo que as fronteiras antrópicas se expandem, os habitats naturais são alterados e reduzidos, remanescendo apenas fragmentos pequenos e isolados. Um dos efeitos mais imediatos dos processos de modificação do ambiente natural é a extinção de espécies locais em paisagens destruídas pela expansão antrópica ou em locais sob influência dessa ocupação (Silvano 2011).

Para amenizar os efeitos deletérios da expansão antrópica sobre as áreas naturais, uma das medidas mais difundidas globalmente é a implementação de reservas naturais. Contudo, no Brasil, muitas das pequenas reservas até alguns dos maiores parques nacionais têm se configurado como ilhas de áreas naturais em meio a matrizes antrópicas. Dessa forma, mesmo que as paisagens e as espécies fiquem protegidas dentro dessas reservas isoladas, as estratégias conservacionistas falham na proteção de um componente oculto da biodiversidade: a diversidade genética (CDB 1992).

Quando as populações se encontram em grandes habitats naturais, elas podem persistir indefinidamente. Contudo, modelos teóricos sobre fragmentação de populações apontavam para uma redução na diversidade genética de populações fragmentadas (McKinney 1997, Morris & Heidinga 1997). Essas populações não seriam capazes de se manter em habitats menores, pois não teriam a capacidade de suprir as altas taxas de extinção local através da migração de indivíduos. Além disso, o isolamento e a redução das populações dos fragmentos levam à depressão endogâmica, fruto da diminuição da heterozigosidade e da redução do fluxo gênico. Com as possibilidades de endocruzamento aumentadas, a população é conduzida mais rapidamente às formas homozigotas. Jones (1924) foi o primeiro a documentar os efeitos da depressão endogâmica no declínio da fecundidade e na viabilidade de algumas plantas. Sabe-se também que a endogamia em populações de aves (Van Noordwijk & Scharloo 1981) e em anfíbios (Hitchings & Beebee 1998), dentre outros organismos, tem efeitos deletérios relacionados com a redução do valor adaptativo (*fitness*) da população (Reed & Frankham 2003).

O valor adaptativo das populações, obtido ao longo do processo evolutivo, confere a habilidade destas responderem a ameaças como doenças, parasitas, predadores e mudanças ambientais. Dados sobre populações de mamíferos e aves mostram que a depressão endogâmica afeta significativamente o peso de nascimento, a sobrevivência, reprodução e a resistência a doenças, predação e ao estresse ambiental (Keller & Waller 2002). A redução da variabilidade genética e do valor adaptativo, por outro lado, pode acelerar os processos de extinção local e regional de uma determinada espécie (Reed & Frankham 2003). Com a extinção regional de uma espécie, a ausência desse

componente da comunidade pode levar à desestruturação da cadeia trófica, acarretando outras extinções.

O efeito do isolamento das populações pode variar de acordo com alguns parâmetros dos fragmentos. Primeiramente, uma densidade local mínima é necessária para que as subpopulações sejam demograficamente viáveis nos habitats remanescentes. Essa densidade deve ser suficientemente alta para tamponar os efeitos da deriva que podem reestruturar geneticamente a população fragmentada. Isso implica que a chance de desestruturação das populações pequenas é maior (Varvio et al. 1986). Além disso, em seguida, a habilidade que uma espécie tem de utilizar ambientes circundantes – a matriz – pode afetar a sua vulnerabilidade no fragmento (Gascon et al. 1999). Ou seja, a permeabilidade da matriz pode determinar o grau de isolamento da área, pois vai condicionar a migração de indivíduos entre os fragmentos. A diferença nas respostas de populações pequenas e grandes ocorre porque, segundo Varvio et al. (1986), o balanço entre mutação e a deriva genética é atingida mais rapidamente em pequenas populações que nas maiores.

Em geral, somente os efeitos da área são abordados nos trabalhos de genética de populações. Dependendo dos atributos ecológicos do táxon, os efeitos da fragmentação do habitat podem levar várias gerações para se manifestar. A combinação do tamanho populacional com o tempo influi diretamente na magnitude a resposta à fragmentação (Amos & Harwood 1998). Poucos estudos abordaram o efeito do tempo de isolamento das populações em sua estrutura genética e, portanto, os efeitos da fragmentação em longo prazo (na escala de dezenas a centenas de anos) permanecem desconhecidos. Foi estimado por modelos teóricos que, ao passar das gerações, as populações isoladas têm uma chance aumentada de que seus alelos sejam fixados (Varvio et al. 1986).

O efeito da fragmentação, no entanto, é menos perceptível do que o efeito da perda de habitat sobre as populações. Esse último pode ser avaliado a partir de medidas de riqueza de espécies ou outras medidas de biodiversidade. Já o efeito da fragmentação afeta aspectos evolutivos das populações, que poucos estudos empíricos foram capazes de documentar (Fahrig 2003). Os efeitos da fragmentação de habitat sobre os animais foram estudados principalmente em florestas, ou praticamente se limitam a algumas populações de aves (Turner 1996, Fahrig 2003, Fischer & Lindenmeyer 2007, Miller et al. 2013). Todavia, fragmentos e mosaicos parecem ser especialmente importantes em ecossistemas mais heterogêneos em sua estrutura e organização fitofisionômica, como o Cerrado (Hiebeler 2000).

O Cerrado, com dois milhões de km<sup>2</sup>, é o maior bioma sul-americano de formação savânica e um dos mais ameaçados pela expansão urbana e agrícola (Eiten 1972, Silva 1995, Ratter et al. 1996). Com o pressuposto de que o Cerrado é um grande mosaico de fitofisionomias florestais, savânicas e

campestres, pode-se inferir que os animais com pouca capacidade de dispersão, estariam extremamente sujeitos à especialização dentro deste bioma. Os indivíduos dessas espécies, de pouca dispersão, se distribuem fortemente associados a habitats particulares, que ocorrem como manchas aleatórias num mosaico de diferentes habitats. Isso faz com que cada espécie, de uma maneira geral, se organize espacialmente em grupos dentro de um bioma heterogêneo em função de suas características requeridas para o habitat (Hanski & Gilpin 1991). Dessa forma, a dinâmica espacial característica do Cerrado é de uma rede de metapopulações associadas aos respectivos mosaicos de habitats, e assim como as populações dos fragmentos, são vulneráveis à quebra do fluxo gênico.

Assim como ocorre com diferentes biomas, cada táxon difere substancialmente na natureza de suas respostas à fragmentação do habitat, consistente com as diferenças em suas histórias de vida e ecologia (ver Carson 1990, Kolozsvary & Swihart 1999). Em espécies de pouca vagilidade por exemplo, a variação interpopulacional tem a tendência a ser alta devido à adaptação local ou simplesmente à divergência devido ao baixo fluxo gênico (Georgiadis et al. 1994). Exemplos disso são os anfíbios, tidos como fracos dispersores com relação aos outros vertebrados (Sinsch 1990, Blaustein et al. 1994) e, portanto, vários experimentos sugerem que os efeitos da fragmentação podem ser particularmente importantes para os animais desse grupo (Hitchings & Beebee 1997, Hitchings & Beebee 1998, Vos & Chardon 1998, Seppä & Laurila 1999). Além disso, a destruição de habitat e a fragmentação são um importante fator de perda de diversidade dos anfíbios e um dos responsáveis pelo declínio mundial desse grupo, segundo alguns pesquisadores (Chusman 2006, Funk et al. 2005, Sjögren 1991, Vos & Stumpel 1996).

Muitos estudos sobre diversidade genética e ecologia populacional se baseiam em espécies raras ou ameaçadas, especialmente nos aspectos de viabilidade das populações estudadas. Contudo, espécies de ampla ocorrência podem fornecer modelos ainda mais consistentes em relação às respostas genéticas e ecológicas das populações frente aos eventos de fragmentação e perda de habitats. Isso porque essas populações permitem uma maior acessibilidade à coleta de dados em diferentes condições (Telles et al. 2007).

Nesse sentido, o “sapo-cachorro” (*Physalaemus cuvieri*) configura-se como uma espécie-modelo para estudos de fragmentação. Esse anuro é extremamente comum e de ampla distribuição pelo território brasileiro. Ele é típico de formações abertas do Cerrado e Caatinga, embora também ocorra em formações florestais na Mata Atlântica. Suas populações, que eram previamente bem distribuídas por grande parte da América do Sul (Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai), atualmente tentem ao

Cristiane Gomes Barreto; Vivian da Silva Braz; Frederico Gustavo Rodrigues França

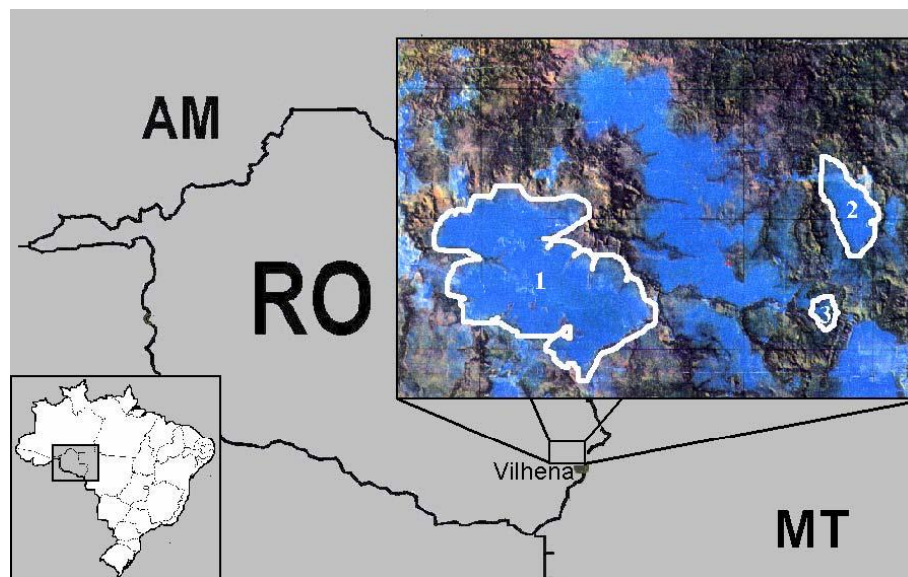
isolamento devido ao crescimento das áreas antrópicas sobre os habitats naturais, mesmo que essa espécie seja relativamente tolerante a ambientes antropizados.

Embora muitos estudos de diversidade genética e conservação tenham focado em populações de espécies raras e ameaçadas a fim de compreender a sua resiliência, espécies como *Physalaemus cuvieri* são informativas em relação à amplitude dos efeitos de isolamento e fragmentação de habitats na biota em geral. A situação em que se encontra o *P. cuvieri* representa um modelo comum às espécies de anfíbios cujas populações têm sido reduzidas e isoladas pela expansão antrópica no Cerrado.

Diante da problemática exposta, investigamos: (01) a estrutura genética de populações isoladas de *P. cuvieri* e (02) o efeito do tempo de isolamento a curto e longo prazo relacionado com o efeito da área dos fragmentos nos componentes da variabilidade genética dessa espécie.

## METODOLOGIA

**Figura 01.** Mapa do Estado de Rondônia com destaque para a imagem TM LandSat 5 (ano de 1999) dos três fragmentos naturais de Cerrado (áreas delimitadas), cercados por florestas



**Fonte:** Os Autores.

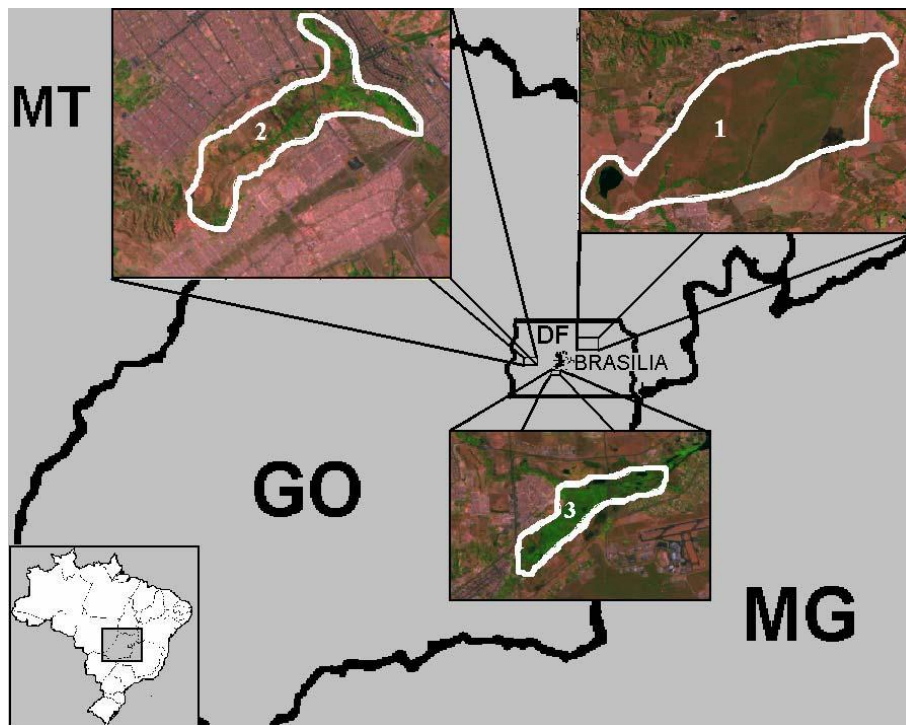
1= Fazenda Cachoeira; 2= Fazenda Planalto e 3= Fazenda Neri. AM=Amazonas, RO=Rondônia e MT=Mato Grosso.

Para interpretar os padrões espaciais e temporais de variação genética foi utilizado um modelo com dois conjuntos de áreas. O primeiro conjunto representa fragmentos de Cerrado que foram isolados naturalmente pelos processos de expansão da Floresta Amazônica a partir do final do período Pleniglacial (cerca de 22.000 a 13.000 anos atrás), no Quaternário até 5.000 anos atrás, no Holoceno médio. Estudos de Sanaiotti (1996) sugeriram que os fragmentos naturais de Cerrado de Rondônia foram naturalmente isolados há cerca de 5.000 a 7.000 anos atrás pela floresta tropical amazônica. Esse

bloco consiste em ilhas periféricas de Cerrado, margeadas por formações florestais, no município de Vilhena, ao sul de Rondônia (Figura 01).

O segundo conjunto representa amostras de fragmentos mais recentes, isolados pela urbanização (fatores antrópicos), na região do Distrito Federal (Figura 02). Os fragmentos antrópicos foram isolados predominantemente por edificações urbanas, há pouco mais de 40 a 50 anos.

**Figura 02.** Mapa do Distrito Federal com destaque para a imagem TM LandSat 5 (ano de 1999) dos três fragmentos antrópicos



**Fonte:** Os Autores.

1= Estação Ecológica de Águas Emendadas; 2= ARIE Juscelino Kubitschek e 3= ARIE Riacho Fundo. MT=Mato Grosso, GO=Goiás, DF=Distrito Federal e MG=Minas Gerais.

Para cada bloco foram amostradas três diferentes categorias de tamanho das áreas, para que se pudesse avaliar, além do tempo de isolamento, o efeito do tamanho do fragmento. No primeiro bloco, em Rondônia, o maior fragmento natural tem cerca de 15.000 hectares e foi representado pela localidade da Fazenda Cachoeira (12°26' a 12°34' S e 60°18' a 60°27' W). A vegetação predominante deste fragmento é de cerrado sensu-stricto, mas também engloba algumas manchas de campo limpo e matas ciliares. O segundo fragmento possui uma área de 1.040 hectares, que engloba a Fazenda Planalto (12°25' a 12°29' S e 60°09' a 60°11' W) e tem como fisionomia predominante o cerrado sensu-stricto. O terceiro e menor fragmento amostrado do conjunto de áreas em Rondônia foi a Fazenda Neri (12°33' a

Cristiane Gomes Barreto; Vivian da Silva Braz; Frederico Gustavo Rodrigues França

12°34' S e 60°05' a 60°11' W), localizada a cerca de 10Km de Vilhena. Com aproximadamente 210 hectares, possui uma formação predominante de cerrado sensu-stricto e Cerradão.

O maior fragmento antrópico amostrado, no bloco de Cerrado do Distrito Federal, foi a Estação Ecológica de Águas Emendadas (15°32' a 15°38' S e 47°33' a 47°37' W) que totaliza 10.547,21ha. de grandes extensões de veredas e campos, cerrado sensu-stricto e algumas matas ciliares. O segundo fragmento, com 2.642,35ha foi representado pela Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) Juscelino Kubitschek (15°49' a 15°53' S e 48°07' a 48°02' W), que engloba parques e reservas particulares conectados por áreas naturais ao longo do córrego Taguatinga. A localidade amostrada tem amplas áreas de campos, lagoas e cerrado sensu-stricto. O menor fragmento antrópico selecionado no Distrito Federal foi a ARIE do Santuário de Vida Silvestre do Riacho Fundo (15°51' a 15°52' S e 47°56' a 47°58' W), com 480 ha. Essa reserva apresenta mosaicos de matas ciliares secas e alagadas com cerrado sensu-stricto, e predominância de campos.

**Figura 03.** Exemplar de sapo-cachorro *Physalaemus cuvieri* no seu sítio reprodutivo



**Foto:** Cristiane Barreto.

O sapo-cachorro (*Physalaemus cuvieri*), cujas populações foram analisadas, é uma das espécies mais comuns de anfíbios no Cerrado (Fig. 03). Com aproximadamente 3 cm de comprimento rostro-anal, *P. cuvieri* (Fitzinger 1826) é um pequeno membro da família Leiuperidae, predominantemente noturno e basicamente terrestre. Eles utilizam as poças e a proximidade da água somente para a reprodução, e no restante do tempo podem ser encontrados longe de cursos d'água mesmo nas épocas secas. Podem ser observados no meio do cerrado assim que começam a dispersar no início da estação chuvosa (setembro a outubro). Durante a estação chuvosa (setembro a abril) os machos dessa espécie formam agregados em determinadas áreas onde emitem vocalizações semelhantes a latidos de cachorro,

ficando em posição semiflutuante em pequenas depressões encharcadas do terreno. Quando ocorre o amplexo, o macho forma um ninho de espuma atritando as patas posteriores no dorso da fêmea.

A amostragem dos anfíbios foi feita através de armadilhas de queda e/ou através de coleta manual. Não houve um padrão de esforço amostral e os indivíduos foram coletados aleatoriamente dentro dos fragmentos. Após a coleta os anfíbios foram dissecados e fixados em formalina 10%. As porções de fígado e músculo retiradas de cada um dos 94 indivíduos coletados foram colocadas separadamente em tubos de criopreservação e armazenadas em nitrogênio líquido ou congeladores a -80°C. Os espécimes coletados foram depositados na Coleção Herpetológica da Universidade de Brasília e seus tecidos processados para a obtenção de DNA.

Para a visualização dos polimorfismos, o marcador utilizado foi o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Assim como a deriva genética e o fluxo gênico, que afetam aleatoriamente todos os *loci* nucleares ao mesmo grau, o RAPD também promove uma amplificação randômica do *pool* de genes nucleares. Essa característica associada à alta quantidade de *loci* amplificados e sua grande acessibilidade, faz do RAPD um marcador molecular muito indicado para análises de estrutura genética de populações (Lynch & Milligan 1994). Foram utilizados 20 amplificadores (*primers*) com 10 bases de nucleotídeos.

Todos os marcadores foram organizados em uma matriz de dados, com a indicação de presença (1) e ausência (0) dos 144 marcadores para 94 indivíduos de *Physalaemus cuvieri*. Foi realizada uma Análise Molecular de Variância (AMOVA) (Excofier et al. 1992) por meio do *software* ARLEQUIN 2.000 (Schneider et al. 2000). Os grupos de populações foram definidos *a priori* e então foi feita a partição da variância total nos seguintes componentes: regiões, populações e haplótipos. Os componentes de variância relativos às diferenças entre regiões ( $\sigma_a^2$ ), entre haplótipos em diferentes populações dentro de cada região ( $\sigma_b^2$ ) e a variância molecular total ( $\sigma_T^2$ ) foram usados para computar o índice de fixação -  $F_{ST}$  (Wright 1965). O  $F_{ST}$  caracteriza a variação entre o haplótipo de uma simples população com relação a toda amostra.

Para avaliar a situação dos haplótipos em níveis regionais e populacionais foram calculados índices  $\hat{\theta}$  (Weir & Cockerham 1984). Os índices  $\hat{\theta}$  são correspondentes às estatísticas F, porém, estimam o nível de subdivisão dentro do respectivo grupo de população ( $\hat{\theta}_s$ ) e entre regiões ( $\hat{\theta}_p$ ).

O índice de diversidade genética total e a média da diversidade genética por loco foram calculados de acordo com Nei (1987). A diversidade genética total ( $H_T$ ) é definida como a probabilidade de que dois haplótipos escolhidos aleatoriamente sejam diferentes em toda a amostra. O  $H_T$  é equivalente à heterozigosidade esperada para a população. A média da diversidade genética por loco



( $H_T$ ) mede a probabilidade de que dois marcadores homólogos escolhidos randomicamente sejam diferentes dentro da população. Ele é equivalente à diversidade genética no nível dos marcadores. Como somente  $H_T$  leva em consideração a diversidade relativa à toda amostra, este foi o índice usado nas análises comparativas de efeito da área e do tempo de isolamento. Enquanto  $H_T$  nos dá noção da variabilidade genética e da estruturação da amostra inteira,  $H_L$  representa o grau de depressão endogâmica dentro de cada população.

Para visualizar a organização das populações quanto às suas distâncias genéticas, foi realizada uma *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) com distância imparcial de Nei (1978), na qual as frequências alélicas foram estimadas por cálculos corrigidos para marcadores dominantes (Lynch & Milligan 1994). Para verificar se a distância geográfica entre os fragmentos reflete uma maior ou menor distância genética entre as populações de *Physalaemus cuvieri* foi realizado um teste de correlação linear utilizando o coeficiente de correlação de Pearson.

As análises estatísticas foram feitas com os *softwares* SYSTAT 5.2 (Systat 1992), *Tool for Population Genetics Analysis – TFGA* (Miller 1997), e R v.3.0.1 software (R Core Team 2013).

## RESULTADOS

A maior parte da variação genética (84,96%) foi detectada no componente intrapopulacional, enquanto que foi observada uma variação de 2,60% entre as populações. Já a variação entre as populações do Cerrado de Rondônia e de Brasília ficou em 12,44%, indicando baixa estruturação geográfica entre as populações da espécie. O valor de  $F_{ST}$  (0,150,  $p < 0,001$ ) indica uma baixa diferenciação regional, ou uma subdivisão mais ou menos extensiva segundo Endler (1977). Da mesma forma, os valores de  $\hat{\theta}_s = 0,217 \pm 0,024$  e  $\hat{\theta}_p = 0,114 \pm 0,022$  ( $p = 0,001$  para ambos) sugerem, respectivamente, que existe uma subdivisão pouco extensiva entre as populações dos fragmentos de cada região e entre as duas regiões.

Os dados revelam, também, uma diversidade genética variável entre as diferentes populações (Tabela 01). Baseado na análise das frequências dos marcadores, a média dos níveis de  $H_T$  das populações dos três fragmentos de Vilhena ( $0.828 \pm 0.150$ ) e dos três fragmentos de Brasília ( $0.996 \pm 0.007$ ) não foram significativamente diferentes (Mann-Whitney,  $p = 0,246$ , G.L.=1). Foi verificada uma forte correlação entre os valores de  $H_T$  das duas regiões ( $r = 0,925$ ,  $p = 0,043$ ), sugerindo que não houve diferenciação significativa ao longo do tempo nos valores de  $H_T$ . Da mesma forma,  $H_L$  também não diferiu significativamente entre as duas regiões (Mann-Whitney,  $p = 0,127$ , G.L.=1). Os valores de  $H_T$  foram positivamente correlacionados com o tamanho do fragmento nos fragmentos de Vilhena

( $r=0,998$ ,  $p=0,041$ ), mas não houve nenhuma correlação para os fragmentos de Brasília ( $r=0,313$ ,  $p=0,797$ ).

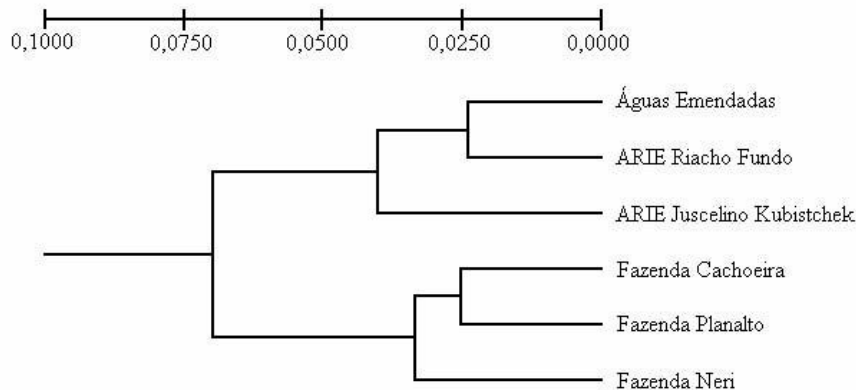
**Tabela 01.** Resumo dos índices de diversidade genética total (HT), média da diversidade genética por loco (HL) e o número de sítios polimórficos para as populações de *Physalaemus cuvieri* de Vilhena, Estado de Rondônia e Brasília, Distrito Federal.

Fragmento	Diversidade genética total (HT)	Diversidade genética por loco (HL)	Número de sítios polimórficos e percentual sobre o total
Águas Emendadas/DF	1,000 ± 0,063	0,277 ± 0,154	98 (68,1%)
ARIE Juscelino Kubitschek/DF	0,987 ± 0,035	0,253 ± 0,134	76 (52,7%)
ARIE Riacho Fundo/DF	1,000 ± 0,030	0,194 ± 0,102	91 (63,2%)
Fazenda Cachoeira/RO	1,000 ± 0,030	0,230 ± 0,121	82 (56,9%)
Fazenda Planalto/RO	0,759 ± 0,089	0,172 ± 0,088	62 (43,1%)
Fazenda Neri/RO	0,725 ± 0,107	0,058 ± 0,040	07 (04,9%)

Fonte: Os Autores.

As distâncias genéticas entre as populações dos fragmentos de Brasília ( $0,035 \pm 0,010$ ) não são significativamente diferentes (Mann Whitney,  $p=0,827$ , G.L.=1) das distâncias entre as populações de Vilhena ( $0,031 \pm 0,008$ ). As distâncias genéticas entre as populações e entre cada grupo de populações (Rondônia e Brasília) estão representadas graficamente na Figura 04.

**Figura 04.** Dendrograma representando as distâncias genéticas de Nei (1987) entre as populações de *Physalaemus cuvieri* de Vilhena-RO e Brasília-DF, feito por Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA).



Fonte: Os Autores.

A média das distâncias genéticas entre as duas regiões foi significativamente maior que entre as populações de cada região (Mann Whitney,  $p=0,002$ , G.L.=1) correspondendo à distância geográfica refletida na diferenciação entre os grupos de populações. As populações de Vilhena foram hierarquicamente estruturadas no dendrograma de acordo com a área correspondente dos fragmentos, o que não pode ser observado para as populações de Brasília. A população da ARIE Juscelino Kubitschek, que é o fragmento de tamanho médio dentre os antrópicos, demonstrou uma distância

genética entre a população da Fazenda Planalto de Vilhena compatível com as medidas entre populações de Brasília. Este é, também, o fragmento que possui maior divergência dentro da sua região.

O que observamos neste estudo foi uma baixa subestruturação genética entre os indivíduos relativos à população inteira ( $F_{ST}=0,150$ ), indicando que, de uma maneira geral, não existe uma subdivisão considerável dos indivíduos de *Physalaemus cuvieri* em grupos distintos. Em maior detalhe, os valores de  $\hat{\theta}_s$  e  $\hat{\theta}_p$  também indicam que há uma subestruturação pouco extensiva entre as populações dos fragmentos dentro de cada região e entre as regiões. Isso sugere que a fragmentação em si proporcionou uma diferenciação genética em pequena escala principalmente entre as populações dentro de cada região.

Os valores de  $F_{ST}$  vão de acordo com os resultados da análise de variância, na qual a maior parte da variação genética encontrada foi entre indivíduos do mesmo fragmento, e somente 2,6% foi a variação entre as populações de cada região.

Adicionalmente, foi encontrada uma correlação significativa entre a distância geográfica dos fragmentos e a distância genética das populações de *Physalaemus cuvieri* ( $r = 0,8297$ ;  $t = 5,3587$ ;  $df = 13$ ;  $P = 0,00013$ ), indicando que quanto maior a distância entre os fragmentos, maior as distâncias genéticas entre as populações dos mesmos.

## DISCUSSÃO

O bioma Cerrado já perdeu quase um milhão de  $\text{km}^2$  ou metade das suas formações naturais para pastagens e culturas anuais de soja, algodão e milho, dentre outras. A tendência é de que, num cenário de inação (*business as usual*), até o ano de 2050, o Cerrado perca mais 120 mil  $\text{km}^2$  das suas paisagens naturais (Lima 2014). Além da perda de habitats naturais, o desmatamento aumenta também a fragmentação e o isolamento dos habitats remanescentes e, conseqüentemente, a depressão endogâmica das populações que ficam isoladas.

Com a evolução do desmatamento no Cerrado, apenas as áreas protegidas conferem alguma garantia de perpetuação das populações vulneráveis da fauna e da flora. Contudo, quase metade (47,3%) das unidades de conservação de proteção integral do bioma Cerrado têm menos de 2,6 mil ha. Essa é a área aproximada do fragmento antrópico médio desta pesquisa, no qual já foi possível detectar redução na diversidade genética total da população de *P. cuvieri*. Caso as tendências de isolamento dos habitats se concretizem, a manutenção da diversidade genética e a evolução continuada das espécies estarão comprometidas.

Varvio *et al.* (1986) sugeriram que a diferenciação entre as populações tende a aumentar com a ausência de fluxo gênico, e as populações perdem diversidade genética, em diferentes proporções, ao passar das gerações e tão rápido quanto menores forem. Mas sabe-se que a diversidade genética pode ser regulada tanto por mutação, deriva genética e seleção quanto por fluxo gênico, enquanto a divergência é determinada somente pelo fluxo gênico. Portanto, os valores de diferenciação obtidos por  $F_{ST}$  ou  $\theta_w^*$  podem ser independentes dos níveis de diversidade genética, isso significa que a divergência entre populações assim como a variabilidade genética na população total e a depressão endogâmica nas populações isoladas são problemas que devem ser analisados separadamente.

Baseando na premissa que os dois grupos de populações de uma mesma espécie compartilhavam originalmente de uma estrutura similar, assumimos que as diferenças observadas entre os grupos de Brasília e de Vilhena se originaram no tempo de formação das matrizes que proporcionaram a fragmentação das populações. Assim sendo, foi verificado que o isolamento de populações pequenas tem como efeito, a redução da diversidade genética em longo prazo, como aconteceu no fragmento de 210ha isolado há cerca de 5.000 anos. E esse efeito de redução está também fortemente correlacionado com a área do fragmento. Ao contrário do que sugeriu Gibbs (1998) para a salamandra *Plethodon cinereus*, isso demonstra que a combinação entre o tempo de isolamento e o tamanho populacional, pôde facilitar os efeitos da deriva genética sobre essa população de *Physalaemus cuvieri*. Entretanto Gibbs (1998) analisou populações isoladas há apenas 200-300 anos, o que pareceu não ser tempo suficiente para reduzir a diversidade genética mesmo de populações pequenas. Observamos resultados compatíveis ao de Gibbs (1998) nas populações de Brasília, isoladas há apenas cerca de 40-50 anos. Apesar da alta diversidade genética intrapopulacional medida por Gibbs (1998), foi observada uma divergência significativa entre as populações de *Plethodon cinereus*, mas que fora atribuído à história de colonização dessas salamandras aos seus fragmentos.

Parte da diferenciação observada neste estudo é influenciada pelo fato de que anfíbios como o *Physalaemus cuvieri* são fracos dispersores e, portanto, mais vulneráveis aos efeitos da fragmentação. Valores de divergência altos têm sido documentados regularmente para anfíbios (Hitchings & Beebee 1997, Larson *et al.* 1984, Telles *et al.* 2007) e as distâncias genéticas entre populações fragmentadas têm refletido sua subestruturação com valores altos. Mas, curiosamente, na situação observada para *Physalaemus cuvieri*, as medidas de divergência ( $F_{ST}$  e  $\theta_w^*$ ) e os valores das distâncias genéticas entre as populações são baixos e muito parecidos dentro das duas regiões. Isso sugere que existe uma alta homogeneidade genética entre as populações e que em Vilhena, apesar de ter um maior número de gerações sofrendo os efeitos do isolamento, a matriz florestal seja mais permeável que a matriz

antrópica em Brasília, cujos fragmentos alcançaram distâncias genéticas equiparáveis com populações isoladas há muito mais tempo.

As matrizes urbanas são eficientes meios de isolamento das populações naturais, mesmo para espécies como o *Physalaemus cuvieri*. Afetar a habilidade dessa espécie de manter o fluxo gênico entre suas populações pode trazer consequências diversas para a manutenção da variabilidade genética, alterando os processos que regem sua evolução e garantem sua sobrevivência.

Hitchings e Beebe (1997) investigaram a estrutura genética de populações de *Rana temporaria* em sítios urbanos e rurais. Seus dados demonstraram que as populações isoladas pela matriz urbana possuíam um grau de subestruturamento significativamente maior que as populações rurais. A principal causa desse cenário foi atribuída ao efeito da matriz, que na paisagem urbana, impõe uma descontinuidade maior entre as populações remanescentes. As estimativas feitas por Scribner et al. (1994) para populações “semi-isoladas” de *Bufo bufo*, que ainda mantêm bastante fluxo gênico, demonstraram distâncias genéticas equiparáveis com as obtidas para *Physalaemus cuvieri* neste estudo. Outra explicação para os baixos valores de distância genética para *Physalaemus cuvieri* é que populações com grande número de indivíduos levam um longo tempo para que ocorra diferenciação genética entre as populações. As populações de *Physalaemus cuvieri* normalmente ocorrem em alta densidade, o que pode estar tamponando os efeitos da deriva genética e mantendo as populações geneticamente homogêneas. Além disso, se o maior valor adaptativo de *Physalaemus cuvieri* estiver relacionado com os fenótipos intermediários, a seleção estabilizadora pode estar agindo sobre as populações mantendo-as próximas do fenótipo ótimo. Quando as populações se encontram próximas deste fenótipo a seleção é extremamente fraca e, portanto, quase não se diferenciam. A reduzida divergência das populações isoladas de *Physalaemus cuvieri* em relação a outros anuros também pode ser atribuída ao fato de que o primeiro já se encontra naturalmente distribuído em forma de metapopulações. Essa espécie se distribui no bioma do Cerrado, que é espacialmente heterogêneo, induzindo as espécies de áreas abertas a se estruturarem em metapopulações. Apesar de se encontrarem subdivididas, com o passar das gerações, a pressão seletiva age igualmente em populações regionalmente próximas homogeneizando-as geneticamente e, portanto, diminuindo as suas distâncias genéticas. Dessa forma, as populações de ambientes heterogêneos podem não se diferenciar tanto quanto as outras populações comparadas, que são, na maioria, de espécies de biomas florestais.

Nos fragmentos antigos, apesar de existir uma composição similar de alelos ou pouca divergência interpopulacional, ainda assim a diversidade genética das populações de *Physalaemus cuvieri* é menor em fragmentos pequenos, o que pode ser prejudicial para a espécie. Foi documentado por

Marsh et al. (1999) que o isolamento de sítios reprodutivos de *Engystomops pustulosus* tem ocasionado uma redução no nível de uso do sítio, e também sugere que isso pode reduzir a taxa de crescimento e sobrevivência de suas larvas, assim como foi documentado por Hitchings and Beebee (Hitchings & Beebee 1997, Hitchings & Beebee 1998) para larvas de *Rana temporaria* e *Bufo bufo*.

## CONCLUSÃO

Com os dados obtidos nesta pesquisa, verificamos que as populações de *Physalaemus cuvieri* não diferiram significativamente com relação às distâncias genéticas e aos componentes intra ou interpopulacional da diversidade genética. Assim, não há uma subdivisão genética significativa para a espécie a partir das populações estudadas. As suas distâncias genéticas são compatíveis com as distâncias espaciais dessas populações.

Por outro lado, o isolamento de populações pequenas de *Physalaemus cuvieri* teve como efeito, a redução da sua diversidade genética em longo prazo, como verificamos no fragmento menor (210 ha) e isolado há cerca de 5.000 anos. Assim, podemos concluir que o efeito de redução da variabilidade genética está também correlacionado com a área do fragmento e a combinação entre o tempo de isolamento e o tamanho populacional, pôde facilitar os efeitos da deriva genética sobre essa população de *P. cuvieri*. Isso nos sugere que o efeito do tempo de isolamento é potencializado em fragmentos menores.

As populações de *Physalaemus cuvieri* isoladas há menos tempo, em Brasília, alcançaram distâncias genéticas equiparáveis com populações isoladas há mais tempo, em Vilhena. É possível concluir com isso que as populações de *Physalaemus cuvieri* isoladas por matrizes urbanas podem ter a sua estrutura genética afetada num espaço de tempo de poucas décadas.

Os efeitos do tempo de isolamento na estrutura genética de populações são questões fundamentais que devem ser consideradas nas decisões conservacionistas para que se possa adequar o manejo das populações atuais garantindo a sobrevivência das futuras gerações. Algumas espécies podem levar várias gerações para manifestar os efeitos da fragmentação de suas populações, enquanto outras o manifestam a curto prazo.

Do ponto de vista da biologia da conservação, outra questão importante é se devemos nos preocupar em manter o máximo de variabilidade da população inteira (ou espécie) ou somente dentro de populações isoladas. Na prática, um tem efeito direto sobre o outro, mas a decisão deve depender da resposta dos organismos à cada situação. Não basta saber se as populações estudadas são “pobres” geneticamente, apresentando níveis de divergência altos ou diversidade genética baixa. É necessário

verificar o sucesso evolutivo, medindo sucesso reprodutivo e viabilidade das populações, e conhecer os níveis de diversidade genética necessários para manter a integridade da espécie sem que o seu valor adaptativo seja alterado. Devemos nos preocupar com a soma da variabilidade genética total, não somente pelos graus de diferenciação entre as populações. Quando as populações são apenas virtualmente isoladas uma da outra, a diversidade genética total pode ainda ser substancial. Além disso, algumas espécies se beneficiam quando estruturadas em metapopulações, onde a ação diferenciada da seleção entre as populações pode levar a especializações particulares, mas que associada a uma alta densidade populacional ou a um alto poder de dispersão da espécie pode compensar o efeito da área, permitindo que a espécie tenha um número populacional efetivo grande, favorecendo processos de seleção mais que os de deriva.

Por precaução, quando não se conhece o efeito e causa das alterações genéticas no sucesso evolutivo da espécie, é recomendado que sua estrutura genética seja mantida o mais próximo possível da estrutura originalmente observada nas populações naturais. Na aplicação da teoria de genética de populações no manejo das espécies, a razão nos conduz à manutenção de populações como unidades panmíticas, ou seja, populações grandes cujos acasalamentos ocorrem ao acaso e assim garantem uma grande variabilidade genética intrapopulacional. Alguns autores têm sugerido a permutação de indivíduos entre populações pequenas como forma de tentar restabelecer um fluxo gênico entre elas (Ralls et al. 1983). Outra alternativa mais pragmática é a criação de corredores ecológicos, que conectariam populações isoladas e permitiria a migração de indivíduos e conseqüentemente o fluxo gênico.

As estratégias de conservação devem se beneficiar de estudos que buscam conhecer tanto as respostas dos organismos em função da mudança em seus parâmetros genéticos quanto os que caracterizam a estrutura genética das populações atuais, para que sejam elaboradas diretrizes que proporcionem seu manejo ideal para que suas características genéticas sejam mantidas.

## REFERÊNCIAS

- Amos W, Harwood J 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical Transactions of Royal Society of London B Biological Sciences* 28:177-186.
- Blaustein AR, Wake DB, Sousa WP 1994. Amphibian declines -Judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology* 8:60-71.
- Carson HL 1990. Genetics of small populations. *Science* 250(4978):191-191.

- CDB (Convenção Sobre Diversidade Biológica) 1992. *List of Parties*. Available from: <http://www.mma.gov.br/destaques/item/7513-conven%C3%A7%C3%A3o-sobre-diversidade-biol%C3%B3gica-cdb>.
- Cushman SA 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological Conservation* 128(2):231-240.
- Eiten G 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review* 38:139-148.
- Endler JA 1977. *Geographic Variation, Speciation, and Clines*. Princeton University Press, Princeton, N. J., U.S.A. 246 pp.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Fahrig L 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 34:487-515
- Fischer J, Lindenmayer D 2007. Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global Ecology and Biogeography*. 16:265-280.
- Funk WC, Greene AE, Corn PS, Allendorf FW 2005. High dispersal in a frog species suggests that it is vulnerable to habitat fragmentation. *Biology Letters* 1(1):13-16.
- Gascon C, Lovejoy TE, Bierregaard RO, Malcolm JR, Stouffer PC, Vasconcelos HL, Laurance WF, Zimmerman B, Tocher M, Borges S 1999. Matrix habitat and species richness in tropical forest remnants. *Biological Conservation* 91:223-229.
- Georgiadis N, Bischof L, Templeton A, Patton J, Karesh W 1994. Structure and history of african elephant populations: I. Eastern and Southern Africa. *The Journal of Heredity* 85:100-104.
- Gibbs JP 1998. Genetic structure of redback salamander *Plethodon cinereus* populations in continuous and fragmented forests. *Biological Conservation* 86(1):77-81.
- Hanski I, Gilpin M 1991. Metapopulation Dynamics - Brief-History and Conceptual Domain. *Biological Journal of Linnean Society* 42:3-16.
- Hiebeler D 2000. Populations on fragmented landscapes with spatially structured heterogeneities: Landscape generation and local dispersal. *Ecology* 81:1629-1641.
- Hitchings SP 1998. Loss of genetic diversity and fitness in Common Toad (*Bufo bufo*) populations isolated by inimical habitat. *Journal of Evolutionary Biology* 11:269-283.
- Hitchings SP, Beebee TJC 1997. Genetic substructuring as a result of barriers to gene flow in urban *Rana temporaria* (common frog) populations: implications for biodiversity conservation. *Heredity* 79:117-127.
- Jones DF 1924. The attainment of homozygosity in inbred strains of maize. *Genetics* 9:405-418.



- Keller LF, Donald MW 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* 17(5):230-241.
- Kolozsvary MB, Swihart RK 1999. Habitat fragmentation and the distribution of amphibians: patch and landscape correlates in farmland. *Canadian Journal of Zoology* 77:1288-1299.
- Larson A, Wake DB, Yanev KP 1984. Measuring gene flow among populations having high levels of genetic fragmentation. *Genetics* 106:293-308.
- Lima TC 2014. *Modelagem dos vetores de mudança na paisagem no bioma Cerrado*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Geociências.
- Lynch M, Milligan BB 1994. Analysis of Population Genetic-Structure with RAPD Markers. *Molecular Ecology* 3:91-99.
- Marsh DM, Fegraus EH, Harrison S 1999. Effects of breeding pond isolation on the spatial and temporal dynamics of pond use by the tungara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Journal of Animal Ecology* 68:804-814.
- McKinney ML 1997. Extinction vulnerability and selectivity: combining ecological and paleontological views. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28:495-516.
- Miller MP, Bianchi CA, Mullins TD, Haig SM 2013. Associations between forest fragmentation patterns and genetic structure in Pfrimer's Parakeet (*Pyrrhura pfrimeri*), an endangered endemic to central Brazil's dry forests. *Conservation Genetics* 14:333-343.
- Miller MP 1997. *Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA)*, version 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Morris DW, Heidinga L 1997. Balancing the books on biodiversity. *Conservation Biology* 11:287-289.
- Nei M 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- R Core Team 2013. R: *A Language and Environment for Statistical Computing*. Available from: <http://www.r-project.org>.
- Ralls K, Ballou J, Brownell RL 1983. Genetic diversity in California sea otters: theoretical considerations and management implications. *Biological Conservation* 25:209-232
- Ratter JA, Bridgewater S, Atkinson R, Ribeiro JF 1996. Analysis of the floristic composition of the Brazilian cerrado vegetation II: comparison of the woody vegetation of 98 areas. *Edinburgh Journal of Botany* 53:153-180.
- Reed DH, Frankham R 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* 17:230-237.
- Sanaiotti TM 1996. *The woody flora and soils of seven Brazilian Amazonian dry savanna areas*. Unpubl. Ph.D. dissertation, University of Stirling.

Scribner KT, Arntzen JW, Burke T 1994. Comparative analysis of Intra- and Interpopulation Genetic diversity in *Bufo bufo*, using allozyme, single-locus microsatellite, minisatellite, and multilocus minisatellite data. *Molecular Biology and Evolution* 11:737-748.

Schneider S, Roessli D, Excoffier L 2000. Arlequin ver. 2000: *A software for population genetics analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

Seppä P, Laurila A 1999. Genetic structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. *Heredity* 82:309-317.

Silva JMC 1995. Avian inventory of the cerrado region, South America: Implications for biological conservation. *Bird Conservation International* 5:291-304.

Silvano DL 2011. Distribuição e conservação de anfíbios no cerrado em cenários atuais e futuros. PhD Thesis. Universidade de Brasília, Brasília. 211p.

Sinsch U 1990. Migration and Orientation in Anuran Amphibians. *Ethology, Ecology and Evolution* 2:65-79.

Sjögren PER 1991. Extinction and isolation gradients in metapopulations: the case of the pool frog (*Rana lessonae*). *Biological Journal of the Linnean Society* 42(1-2):135-147.

Systat 1992. *Systat for Windows: Statistic, Version 5 Edition*. SYSTAT Inc: Evanston, IL.

Telles MPC, Diniz-Filho JAF, Bastos RP, Soares TN, Guimarães LD, Lima LP 2007. Landscape genetics of *Physalaemus cuvieri* in Brazilian Cerrado: Correspondence between population structure and patterns of human occupation and habitat loss. *Biological Conservation* 139(1-2):37-46.

Templeton AR 1980. Modes of speciation and inferences based on genetic distances. *Evolution* 34:719-729.

Templeton AR, de Salle R, Walbot V 1981. Speciation and inferences on rates of molecular evolution from genetic distances. *Heredity* 47:439-442.

Turner IM 1996. Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. *Journal of Applied Ecology* 33:200-209.

van Noordwijk AJ, Scharloo W 1981. Inbreeding in an island population of the great tit. *Evolution*, 35:674-688.

Varvio SL, Chakraborty R, Nei M 1986. Genetic variation in subdivided populations and conservation genetics. *Heredity*, 57:189-198.

Vos CC, Chardon JP 1998. Effects of habitat fragmentation and road density on the distribution pattern of the moor frog *Rana arvalis*. *Journal of Applied Ecology*, 35:44-56.

Vos CC, Stumpel AHP 1996. Comparison of habitat-isolation parameters in relation to fragmented distribution patterns in the tree frog (*Hyla arborea*). *Landscape Ecology*, 11:203-214.

Weir BS, Cockerham CC 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. *Evolution*, 38:1358-1370.

Willis EO 1979. Populations and local extinctions of birds on Barro Colorado Island, Panamá. *Ecological Monographs*, 44:153-169.

Wolf PG, Soltis PS 1992. Estimates of gene flow among populations, geographic races, and species in the *Ipomopsis aggregata* complex. *Genetics*, 130:639-647.

Wright S 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19:395-420.

## Lessons for Conservation Biology in the Cerrado from Population Genetic Diversity Patterns of the Amphibian *Physalaemus cuvieri*

### ABSTRACT

The fragmentation of natural habitats has increased in the last decades. In this work, the effects of habitat fragmentation upon the genetic structure of populations of the Barker frog *Physalaemus cuvieri* were studied. Frogs were sampled in three naturally isolated fragments of Cerrado from Vilhena (Rondônia) and three anthropic Cerrado fragments from Brasília (Distrito Federal). RAPD was used as molecular marker and results showed that both groups of populations were not different in their genetical distances and interpopulational or intrapopulational components of genetic diversity. However, subpopulations are fairly extensive differentiated and the genetical diversity was correlated with the fragment size for long time isolated fragments. Results suggest that small populations of *Physalaemus cuvieri* can have their genetic structure affected by long time fragmentation. Management of these populations is suggested to avoid anthropogenic changes in their genetic structure.

**Keywords:** Genetic Structure; Habitat Fragmentation; *Physalaemus cuvieri*; RAPD; Isolated Populations.

Submissão: 27/09/2016

Aceite: 28/11/2016